

具有抑制血管生成及抗肿瘤作用的 强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 及其用途

发明领域

本发明涉及一种具有抑制血管生成作用、强烈杀伤肿瘤细胞活性和抗肿瘤治疗效果的新型抗体导向药物，强化融合蛋白 Fv-LDP-AE，其制备方法，及其用于制备抗肿瘤药物的用途。

背景技术

基质金属蛋白酶在癌细胞侵袭转移进程中扮演着重要角色，尤其 IV 型胶原酶 MMP-2 和 MMP-9 可降解 IV 型胶原等细胞外基质组分，破坏基底膜及细胞外基质的完整性，有助于肿瘤细胞的侵袭与转移，在肿瘤新生血管内皮细胞的表达量高于正常组织血管内皮细胞。抑制基质金属蛋白酶的活性可以抑制肿瘤细胞的侵袭转移和肿瘤血管生成。因此，以基质金属蛋白酶 MMP-2/MMP-9 单抗作为导向药物的载体不仅可以提供肿瘤的靶向性，而且其本身就具有抗肿瘤效应。本发明所涉及的抗 MMP-2/MMP-9 单抗 3G11 对多种肿瘤细胞均呈免疫学阳性反应，并与多种人体肿瘤组织，尤其消化道肿瘤组织有特异性结合能力。

单链抗体 (scFv) 通常是用一段柔性肽链将 V_H 和 V_L 连接构成的具有完整抗原结合位点的最小抗体功能片段。scFv 较 Fv 片段更稳定，并且 scFv 分子较完整抗体对实体瘤的渗透能力强，因而更适于作为单抗导向药物的载体。

高活性的“弹头”药物力达霉素 (Lidamycin, 以下简称 LDM, 亦称 C-1027 或 C1027) 是从我国湖北省潜江县土壤中分离得到的由一株球孢链霉菌 (*Streptomyces globisporus*, 菌种保藏号为: CGMCC No. 0135) 产生的烯二炔类抗生素, 是迄今报道过的对肿瘤细胞杀伤

作用最强的大分子肽类抗肿瘤抗生素。体内动物实验表明, LDM 对小鼠结肠癌 26 有非常显著的疗效, 对移植于裸鼠的人肝癌 Bel-7402 和盲肠癌 Hce-8693 等多种人体移植肿瘤均有显著疗效(中国抗生素杂志 1994, 19<2>: 164-168)。

LDM 的分子由两部分组成: 其一为烯二炔结构的发色团(chromophore), 具有细胞毒作用, 但不稳定; 其二为 110 个氨基酸残基组成的辅基蛋白(LDP), 对发色团的稳定性起保护作用。LDM 分子中的发色团以两种形式存在: 活性型发色团(即活性型烯二炔形式, active enediyne, AE) 和失活型发色团(inactivated chromophore)。由于 AE 的烯二炔结构极不稳定, 约 1 小时后几乎全部失活, 即 AE 发生不可逆的芳构化反应转化为结构稳定的失活型发色团。而 AE 是 LDM 发挥作用的活性部分, 辅基蛋白仅有保护 AE 的功能, LDM 分子中 AE 含量的高低决定其作用的强度。因此为了使 LDM 具有高强度的生物活性, 必须保证 LDM 发色团中的 AE 的高百分含量。

本发明是在新构建的融合蛋白 Fv-LDP 的基础上, 严格控制所用发色团的质量, 使用具有极强活性的活性型烯二炔发色团(AE)进行分子强化, 获得强化融合蛋白 Fv-LDP-AE, 作为抗肿瘤效果更佳的新型抗体导向药物。

发明内容

单抗靶向药物的小型化、高效化以及寻找新的特异性肿瘤靶标是解决单抗治疗剂当前存在问题的主要有效途径。本发明人运用基因工程技术构建获得的单链抗体 scFv 与力达霉素制备的免疫导向融合蛋白, 能够有效地将效应分子导向特异性肿瘤靶部位, 比用化学偶联技术获得的免疫偶联物具有分子均一性及高效小型化等优点。

本发明的一个方面，涉及所述强化融合蛋白 Fv-LDP-AE，是由抗基质金属蛋白酶 MMP-2/MMP-9 的单链抗体 scFv (3G11)、力达霉素辅基蛋白 LDP 和二者之间的柔性肽间隔基 (GGGGS) 以及羧基端的组氨酸六聚体尾 (His₆-tag) 形成的融合蛋白 Fv-LDP 以及力达霉素活性型烯二炔发色团 AE (分子量为 843 kDa) 组成。

1. 融合蛋白 Fv-LDP

具体的，本发明所述融合蛋白 Fv-LDP 的编码基因全长 1119 bp (如 SEQ ID NO: 1 所示)，编码 372 个氨基酸 (如 SEQ ID NO:2 所示)，分子量约为 38.7 kDa。

本实验室以往制备了组装型融合蛋白 LDM-Fv (药学报 2000, 35<7>: 488-491)，与本发明所述单链抗体相比，其杂交瘤细胞株来源不同。本发明所述单克隆抗体 scFv (3G11) 来源于小鼠抗 IV 型胶原酶 (包括 92 kDa 和 72 kDa) 的杂交瘤细胞株 3D6，而组装型融合蛋白 LDM-Fv (药学报 2000, 35<7>: 488-491) 中所述单克隆抗体 scFv-M97 来源于小鼠抗 IV 型胶原酶 (92 kDa) 的杂交瘤细胞株 C2H5。二者的 scFv 基因序列经比较发现同源性为 91%，本发明所述 scFv (3G11) 的编码基因全长 741 bp，而 scFv-M97 编码基因的基因全长 732 bp；尤其是，本发明所述单链抗体 scFv (3G11) 与 scFv-M97 的核苷酸序列在 VH 链的 CDR2 区有 2 处以及 VH 链的 CDR3 区有 6 处可导致所编码氨基酸序列改变的差异。

二者在核苷酸序列的不同，使其所编码的氨基酸序列也有所不同，因此本发明所述 scFv (3G11) 在抗原的特异性识别和抗原抗体结合特性上与 scFv-M97 之间有明显差别。

本发明中的 scFv (3G11) 的亲本单抗 3G11 具有与其抗原 MMP-2/9 较高的免疫结合性，通过 Western-blotting 分析已经得到证实；而且，实验证实来源于杂交瘤细胞株 3D6 的单抗 3G11 在多种人体肿瘤组织中呈现免疫学活性 (李亮，刘秀均，甄永苏。抗

IV 型胶原酶单抗的肿瘤靶向性分布及其抗肿瘤作用的研究。2002 全国肿瘤学术大会论文集 2002: 202), 并在裸鼠体内的异种人肺癌组织中靶向性分布[戴珏, 贾兵, 甄永苏, 等。抗IV型胶原酶单抗在人肺癌裸鼠移植模型中的免疫显像。癌症 2003, 22 (12): 1243-1248]。而且, 研究证明 scFv (3G11) 片段仍然保持有亲本单抗 3G11 的免疫结合活性(唐勇, 甄永苏。抗IV型胶原酶单链抗体的表达及其对肿瘤细胞侵袭的抑制作用。癌症 2001, 20: 801-805)。

本发明新构建的融合蛋白 Fv-LDP 在单链抗体 scFv (3G11) 与力达霉素辅基蛋白 LDP 之间插入一小段柔性肽间隔基 (GGGGS), 使 scFv 与 LDP 能够分别进行正确折叠, 形成各自原有的空间构象, 从而不会影响其各自的生物学活性。

2. 活性型烯二炔发色团 AE

已知 LDM 的分子量为 11349.1120 Da。其中辅基蛋白 LDP 的分子量为 10505.7830 Da, 发色团分子量为 843.3295 Da。LDM 的活性型及失活型发色团的化学结构式和分子式如下所示:

LDM 发色团的化学名 (中英文):

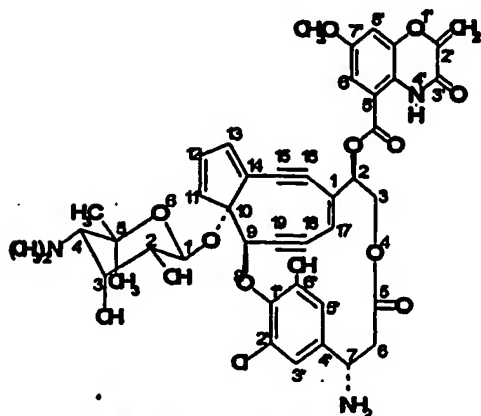
(2R, 7S, 9R, 10R)-7-氨基-7,8-(2*-氯-6*-羟基-1*,4*-亚苯基)-10-(4'-去氧-4'-二甲氨基-5',5'-二甲基-吡喃核糖基)-4,8-氧杂-5-氧代-1,11,13-三烯-15,18-二炔-三环[7,7,3,0^{10,14}]-2-十九碳醇-2'',3''-二氢-7''-甲氧基-2''-亚甲基-3''-氧代-1'',4''-苯并恶嗪-5''-羧酸酯。

(2R,7S,9R,10R)-7-Amino-7,8-(2*-chloro-6*-hydroxy-1*,4*-phenylene)-10-(4'-deoxy-4'-dimethylamino-5',5'-dimethyl-ribofuranosid o)-4,8-dioxo-5-oxo-1,11,13-trien-15,18-diyn-tricyclo[7,7,3,0^{10,14}]-2-nondecanyl-2'',3''-dihydro-7''-methoxy-

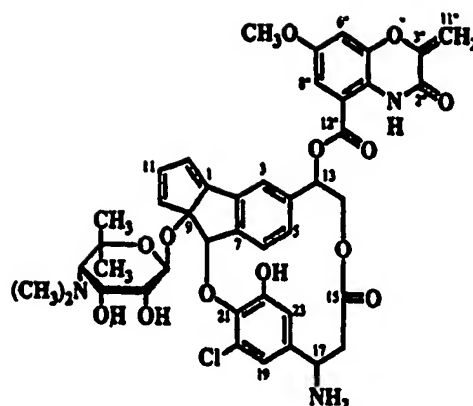
2''-methylene-3''-oxo-1'',4''-benzoxazine-5''-carboxylate

发色团化学结构式 (如图):

分子式: $C_{43}H_{42}O_{13}N_3Cl$



力达霉素活性型烯二炔发色团 AE

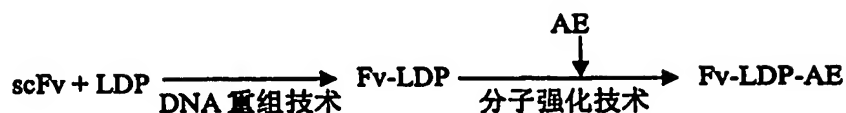


力达霉素发色团芳构化产物结构式

已知 LDM 的发色团与辅基蛋白通过非共价键结合, 两者的结合具有特异性和牢固性。而且, LDM 可以拆分和进行分子强化, 这一独特的分子结构特点及其低分子量和高效活性等优势, 使 LDM 成为构建新型单抗导向药物的理想“弹头”药物(中国医学科学院学报 2001, 23<6>: 563-567)。

本发明又一方面, 涉及强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 的制备。具体的, 本发明是在新构建的融合蛋白 Fv-LDP 的基础上, 严格控制所用发色团的质量, 使用具有极强活性的活性型烯二炔发色团 (AE) 进行分子强化, 获得强化融合蛋白 Fv-LDP-AE, 作为抗肿瘤效果更佳的新型抗体导向药物。该融合蛋白利用抗 MMP-2/9 单链抗体 scFv (3G11) 的结合特异性, 将高效的力达霉素发色团 (AE) 靶向于抗原高表达的肿瘤组织部位, 发挥对肿瘤细胞的高细胞毒作用, 显示强烈的抑制血管生成活性, 并在体内动物试验中具有显著疗效, 展示了良好的应用前景。

具体的，包括其制备技术路线为：



在本发明中所用 LDM 的制备方法参见 2000 年 8 月 10 日向中国专利局提交并于 2003 年 10 月授权的中国专利（专利申请号：00121527.2）。一般来说，通过测定 AE 在发色团总量中的相对含量，即可确定 LDM 制品的活性高低。通常采用 HPLC 分析来测定 LDM 制品中 AE 占发色团总量的百分比值，以 AE 大于或等于发色团总量的 80% 作为 LDM 合格制品的质量标准。

在本发明的一个具体实施方案中，分子强化是通过如下步骤进行的：将 Fv-LDP/0.01 M PBS (pH 7.0) 与 AE 甲醇溶液按分子比 1:5，体积比 1:50 混合搅拌，室温反应 12 h，得到强化融合蛋白 Fv-LDP-AE。

本发明人意外地发现，通过采用高比例 AE 进行分子强化，能够大大提高所得强化融合蛋白的活性。在本发明中，优选采用 AE 百分比值大于 80% 的 LDM 合格制品，特别优选的采用 AE 百分比值大于 90% 的 LDM 进行分子强化，制备强化融合蛋白。在本发明中，高质量 LDM 中的 AE 百分比值最高可达 90.63%。

本实验室以往制备组装型融合蛋白 LDM-Fv 所需的发色团是从旧制备方法所得的低活性 LDM 中提取的，其中 AE 所占比例仅为 60%，未能获得具有更强的肿瘤细胞细胞毒活性的产物。体外克隆形成法测定组装型融合蛋白 LDM-Fv 的细胞毒活性，其 IC_{50} 值为 $9.5 \times 10^{-15} M$ ，比本发明所述强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 的 IC_{50} 值 ($1.65 \times 10^{-16} M$) 低 58 倍；并未在人体结肠癌组织中观察到免疫结合活性，未见强烈抑制血管生成的作用，亦未能在动物实验中证明其疗效。

本发明的再一方面涉及,所述强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 用于制备治疗人体恶性肿瘤,如结肠癌、直肠癌、食管癌、胃癌、肝癌、乳腺癌、卵巢癌、肺癌和肾癌等多种实体瘤,尤其是消化道肿瘤的药物组合物的用途。

本发明又一方面,还涉及含有治疗有效量的本发明所述强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 的药物组合物,任选的,所述药物组合物还含有与所述药物组合物的给药方式和剂型相适应的药学可接受的载体和赋型剂。

本发明再一方面还涉及一种治疗恶性肿瘤的方法,包括向恶性肿瘤患者施用治疗有效量的本发明所述的强化融合蛋白或药物组合物。

本发明的研究证明,强化融合蛋白在 IV 型胶原酶高表达的人体结肠癌组织中呈选择性分布,对肿瘤细胞显示强烈的杀伤活性,有高度的抑制血管生成作用,动物实验有非常显著的治疗效果。经检索,迄今国内外尚未见有类似的强化融合蛋白的有关报道,是目前已知的在体内证实具有显著抗癌疗效的分子量最小的免疫导向融合蛋白。

附图说明

图 1: scFv 和 LDP 基因的 PCR 扩增及重组克隆载体的限制性内切酶分析。其中:1- DNA 分子量标准;2- scFv 的 PCR 产物;3- LDP 的 PCR 产物;4- 重组质粒 pGEM-T-scFv/Nde I + EcoR I; 5- 重组质粒 pGEM-T-LDP/EcoR I + Xho I。

图 2: 转化菌株 CAMS/FLDFP 中重组表达质粒 pEFL 的限制性内切酶分析。其中:1- DNA 分子量标准;2- 质粒 pET-30a (+);3- 重组质粒 pEFL;4- pET-30a (+)/Nde I + EcoR I;5- pEFL/Nde I + EcoR I; 6- pET-30a (+) /EcoR I + Xho I; 7- pEFL/EcoR I + Xho I; 8-

pET-30a (+) /Nde I + Xho I; 9- pEFL/Nde I + Xho I

图 3: 融合蛋白 Fv-LDP 表达产物的 SDS-PAGE 分析。其中: 1- 蛋白分子量标准; 2- BL21 (DE3) starTM / pET-30a (+) IPTG 诱导前全菌蛋白; 3- BL21 (DE3) starTM /pET-30a (+) IPTG 诱导后全菌蛋白; 4- 转化菌株 CAMS/FLDFP 经 IPTG 诱导前全菌蛋白; 5- 转化菌株 CAMS/FLDFP 经 IPTG 诱导后全菌蛋白; 6- 转化菌株 CAMS/FLDFP 经 IPTG 诱导后菌体上清; 7- 转化菌株 CAMS/FLDFP 经 IPTG 诱导后菌体包涵体沉淀。

图 4: 融合蛋白 Fv-LDP 的 Western-blot 分析。其中: A: 以抗力达霉素辅基蛋白单抗 F9 为一抗; B: 以抗组氨酸标记尾单抗为一抗; 1- BL21 (DE3) starTM / pET-30a(+)IPTG 诱导前全菌蛋白; 2- BL21 (DE3) starTM /pET-30a(+)IPTG 诱导后全菌蛋白; 3- 转化菌株 CAMS/FLDFP 经 IPTG 诱导前全菌蛋白; 4- 转化菌株 CAMS/FLDFP 经 IPTG 诱导后全菌蛋白; 5- 转化菌株 CAMS/FLDFP 经 IPTG 诱导后菌体包涵体沉淀; 6- 转化菌株 CAMS/FLDFP 经 IPTG 诱导后菌体上清。

图 5: 融合蛋白 Fv-LDP 经金属螯合层析纯化的 SDS-PAGE 分析。其中: 1- 蛋白分子量标准; 2、3- 未上亲和层析柱前样品; 4- 结合缓冲液洗柱后收集的液体; 5- 以 20mM 咪唑漂洗缓冲液洗柱后收集的液体; 6-10- 以 1M 咪唑洗脱缓冲液洗柱后每隔 1 h 收集到的蛋白组分。

图 6: 强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 的分离纯化。其中: 分析柱: PD-10; 流动相: PBS, pH 7.0; 峰 1- 纯化的强化融合蛋白 Fv-LDP-AE; 峰 2- 未反应的过量的 AE。

图 7: ELISA 分析融合蛋白 Fv-LDP 与 IV 型胶原酶和不同肿瘤细胞的免疫反应性。其中: ▲IV 型胶原酶; ■ HT-29 细胞; ◆ HT-1080 细胞。

图 8: 免疫组化染色分析融合蛋白 Fv-LDP 与人体结肠癌组织的免疫学活性。其中: A: Fv-LDP 在人结肠癌组织中的免疫组化染色; B: 阴性对照, 以 PBS 替代 Fv-LDP 为一抗; 放大倍数为 200 倍, 图中标尺为 20 μm 。

图 9: 融合蛋白 Fv-LDP 对 HT-1080 细胞的 IV 型胶原酶谱分析。其中: 1- PBS; 2-空载体经 IPTG 诱导后所得全菌蛋白; 3-完整单抗 3G11 (6 μM); 4- 融合蛋白 Fv-LDP (30 μM)

图 10: 强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 对 bFGF 刺激鸡胚尿囊膜血管生成的抑制作用。其中: A: 仅 PBS 处理后的鸡胚尿囊膜血管; B: 以 bFGF 为刺激物, PBS 处理后的鸡胚尿囊膜血管; C: 以 bFGF 为刺激物, LDM (0.1 μg /鸡胚) 处理后的鸡胚尿囊膜血管; D: 以 bFGF 为刺激物, Fv-LDP-AE (0.4 μg /鸡胚) 处理后的鸡胚尿囊膜血管。

图 11: 强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 对肿瘤细胞 HT-29 的杀伤活性。其中: ◆ Fv-LDP-AE; ■ LDM

图 12: 强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 对小鼠体内肝癌 H22 生长的抑制作用。其中: ◆ 对照; ▲ Fv-LDP 组; ■ LDM 组; △ Fv-LDP-AE3.2 组; ◇ Fv-LDP-AE1.6 组; □ Fv-LDP-AE0.8 组。

图 13: 力达霉素的 HPLC 图谱分析。其中: 分析柱: Delta-PAK C4 5 μm , 300A 150 \times 3.9mm I.D.; 流动相: 乙腈/0.025% 三氟醋酸 (20%: 80%) =23: 77, 流速: 0.6 ml/min, 检测波长: 350 nm

图 14: 力达霉素活性型烯二炔发色团 AE 的质谱分析。其中: 测试仪器: Quattro LC 串联四机杆质谱仪; 配有电喷雾离子源(英国 MICROMASS 公司); 样品溶于 50 %乙腈, 浓度为 0.5mg/ml, 经注射泵直接注入电喷雾离子源进行质谱分析。AE 主峰 m/z 为 844.4(M+1); 发色团芳构化产物峰的 m/z 为 846.4 (M+1); 氯的同位素峰 m/z 为 848 (M+1); 杂峰可能为样品纯度不够或某些变异所

致。

实施例 1 力达霉素辅基蛋白 LDP/抗 MMP-2/9 单链抗体 scFv (33G11) 的融合基因的克隆

重组质粒 pCANscFv 或 pPIC-9kFv1027 和 pIJ1027GRGDS 分别含有 scFv 基因和 LDP 基因, 由本实验室保存。pGEM-T 载体为美国 Promega 公司产品, 大肠杆菌菌种 *E. coli* DH5a 系本实验室保存。PCR 引物由赛百盛公司合成, 分别引入相应的限制性内切酶 (TaKaRa 公司产品) 的酶切位点。

scFv 5'端引物 (PH1, SEQ ID NO: 3):

5' CGCATATG CAGGTGAAGCTGCAGCAGTCT 3'

Nde I

V_H

scFv 3'端引物 (PL2, SEQ ID NO: 4):

5' CGGAATTC TGAACCGCCTCCACC ACGTTTGATTTCAG 3'

EcoR I

间隔基

V_L

LDP 5'端引物 (PLD1, SEQ ID NO: 5):

5' CGGAATTC GCGCCCGCCTTCTCCGTCAGTCCC 3'

EcoR I

LDP

LDP 3'端引物 (PLD2, SEQ ID NO: 6):

5' CCGCTCGAG TCAGCCGAAGGTCAGAGCCACGTG 3'

Xho I

LDP

以重组质粒 pCANscFv 或 pKFv1027 为模板, PH1 为 5'引物, PL2 为 3'引物进行 PCR 扩增, 获得 C 端带有一段小肽间隔基的单链抗体 scFv 基因片段; 同时以重组质粒 pIJ1027GRGDS 为模板, PLD1 为 5'引物, PLD2 为 3'引物进行 PCR 扩增, 获得 LDP 基因片段。

PCR 反应体系为 94℃预变性 2 分钟, 然后进行 25 轮 PCR 循环:

94℃变性 1 分钟, 55℃(scFv 基因的扩增)或 58℃(LDP 基因的扩增)退火 1 分钟, 72℃延伸 1 分钟, 最后一个循环后在 72℃保温 10 分钟。

两种 PCR 产物利用 DNA 片段玻璃奶回收试剂盒 (BioDev 公司产品) 纯化回收后, 依 Promage 公司试剂盒提供方法与 Promage 公司的 pGEM-T 载体相连, 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选出重组 T 载体 pGEM-T-Fv 和 pGEM-T-LDP 进行酶切鉴定 (图 1), 分别由上海生工生物公司进行序列测定, scFv (3G11) 基因全长 741 bp, 编码 247 个氨基酸, LDP 基因全长 342 bp, 编码 114 个氨基酸, 二者之间的柔性肽间隔基基因 15 bp, 编码 5 个氨基酸, 编码羧基端的组氨酸六聚体尾的基因为 18 bp, 编码 6 个氨基酸以及终止密码子 3 bp, 基因全长 1119 bp, 编码 372 个氨基酸。

实施例 2. 融合蛋白大肠杆菌重组表达质粒 pEFL 的构建

本发明选用的大肠杆菌表达质粒 pET30a (+) (Invitrogen 公司产品) 为本实验室保存。将重组克隆质粒 pGEM-T-Fv 用 Nde I 和 EcoR I、重组克隆质粒 pGEM-T-LDP 用 EcoR I 和 Xho I 进行双酶切获得酶切后片段, 经琼脂糖凝胶电泳分离回收。将上述两个片段克隆至经 Nde I 和 Xho I 双酶切的表达载体 pET30a (+) 内, 转化入宿主菌 BL21(DE3) starTM (Invitrogen 公司产品) 的感受态细胞, 筛选获得转化子并提取重组质粒。

将获得的重组表达质粒进行酶切鉴定, 表明其中含有正确的插入片段 (图 2)。应用两条 T7 通用引物进行测序, 结果表明该融合基因 Fv-LDP 序列与预期的序列完全一致。本发明使用的表达质粒 pET-30a (+), 在其多克隆位点的 3'端融合有一段编码组氨酸六聚体尾 (His₆-Tag) 的基因序列, 经翻译表达后, His₆-Tag 便于融合蛋白的表达鉴定与分离纯化。

实施例 3. 融合蛋白 Fv-LDP 在大肠杆菌 BL21 (DE3) starTM 中的诱导表达

从 LB 平板上挑取上述转化子接种到含有 50 $\mu\text{g/ml}$ 卡那霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡过夜; 次日按 1:50 转种, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.9, 向培养物中加入终浓度为 0.8 mmol/L 的异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG), 诱导培养 4-6 小时, 取 1ml 培养液, 12000 rpm 离心 1 分钟收集菌体, 去上清, 菌体细胞重悬在 300 μl PBS 中, 超声破碎菌体后, 12000 rpm 离心 10 分钟, 分别收集上清, 沉淀重悬在 300 μl PBS 中; 以 12% SDS-PAGE 电泳分析外源蛋白的表达情况, 融合蛋白以不可溶的包涵体形式得到表达 (图 3)。凝胶成像系统定量分析显示, 以最佳条件诱导表达获得的融合蛋白的表达量占转化子菌株总蛋白的 30% 以上, 最终挑选出最优表达融合蛋白的转化菌株。

其中一株含有能够表达融合蛋白 Fv-LDP 的 pEFL 质粒, 命名为 CAMS/FLDFP, 于 2003 年 6 月 24 日送交位于北京的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏, 保藏编号: CGMCC No. 0960。

以 Western Blot 检测分析, 12% SDS-PAGE 电泳后在 Bio-Rad 电转移槽中进行半干电转, 电转移条件为: 恒电流 0.65 mA/cm², 时间约 1.5-2 小时。电转结束后的 PVDF 膜分别与含有封闭液稀释的一抗 F9 单抗或抗 His-Tag 单抗孵育, 以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体为二抗, 进行显色分析, 转化菌株 CAMS/FLDFP 成功表达了融合蛋白 Fv-LDP (图 4)。

实施例 4. 融合蛋白 Fv-LDP 的亲和层析纯化及分离制备

采用 His - Bind 纯化试剂盒 (Novagen 公司产品) 于变性条件

下纯化蛋白样品。经预处理亲和柱后，以 3 体积含 6 M 尿素的 1× 结合缓冲液(20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM 咪唑, pH 7.9) 平衡层析柱，再以如上述实施例制备的变性蛋白样品上柱后，依次以 10 体积的含尿素 1×结合缓冲液(20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM 咪唑, 6 M 尿素, pH 7.9), 6 体积含尿素 1×洗涤缓冲液(20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 60 mM 咪唑, 6 M 尿素, pH 7.9)洗涤层析柱，最后以 6 体积含 6M 尿素的 1×洗脱缓冲液 (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 1 M 咪唑, 6 M 尿素, pH 7.9) 进行洗脱，收集洗脱组份获得纯化后的融合蛋白 Fv-LDP (图 5)。

继而行透析复性，蛋白样品依次对复性缓冲液 I (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 3 M 尿素, 5 mM EDTA, pH 8.0)、复性缓冲液 II(20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 1 M 尿素, 5 mM EDTA, 0.2 mM GSSG, 2 mM GSH, 0.4 M L-Arg, pH 8.0)和复性缓冲液 III(20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0)分别进行 12-24 h 透析，再以 PBS (pH 7.4) 透析 24 h，以超滤离心管 Cenrtiplus-YM 或 Ultrafree-MC 经 12, 000g 离心浓缩，经 PD-10 (Sephadex G25 商业柱) 脱盐、冷冻干燥，于 -80℃ 保存备用。

实施例 5.力达霉素的制备及其活性型发色团 AE 的相对含量测定

1. 力达霉素的制备

将力达霉素产生菌 (CGMCC NO. 0135) 冷干管中加 0.7 ml 无盐水，使之形成菌悬液，用白金耳接种于高氏 1 号斜面培养基培养，28℃，7-10 天，表面生长白色气生菌丝，取一小块接种于一级种子 100 ml/500 ml 三角瓶培养 (发酵培养基成分为：淀粉 1%，玉米浆 0.5%，血胨 0.5%，葡萄糖 0.5%，MgSO₄ 0.02%，KI 0.06%，玉米面 1.5%，CaCO₃ 0.4%，自来水配制，pH 7.0，15 磅消毒)，28℃，

旋转摇床培养 48 h, 在转种 5% 于 1000 ml/5000 ml 立瓶中作为二级种子, 以相同发酵培养基培养, 28℃, 往返摇床培养 18 h, 上 200 L 发酵罐, 装量为 100 L, 接种量 2%, 加 0.03% 泡敌为消沫剂, 罐压 0.04, 28℃, 搅拌 400 转/分, 气流 1/1, pH 6.5-7.0, 发酵 96 h, 得到所需发酵液。取发酵液 10 L, 离心取上清, 以 HCl 调至 pH 4.0, 加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4.5 Kg 于 8℃ 搅拌 3 h, 析出的力达霉素离心分离 (4℃, 8000 转/分, 15 min), 所得的沉淀物加 200 ml 冷水溶解, 透析, 再离心除去不溶物, 上清液经羟基磷灰石柱吸附, 0.001 M 磷酸缓冲液 (pH 6.8) 洗脱, 活性部分冷冻干燥, 得粗制品 1500 mg。粗制品溶于水, 经 Sephadex G-75 柱层析, 活性部分冷冻干燥后, 得到 145 mg 抗肿瘤高活性的力达霉素白色粉末精制品。

2. 活性型发色团 AE 的相对含量测定

与 LDM 蛋白部分相比, 发色团分子量较小, 其理论含量仅占力达霉素的 7.4 %。由于 AE 是 LDM 发挥作用的活性部分, 辅基蛋白仅有保护 AE 的功能, 因此一般通过测定 AE 在发色团总量中的相对含量, 即可以确定 LDM 制品的活性高低。

采用 HPLC 对 LDM 进行分析可以测得 AE 占发色团总量的百分比值, 具体方法为:

将如上述制备的 LDM 制品溶于 HPLC 流动相 (乙腈: 水为 23:77), 在 FPLC 快速蛋白色谱仪上经 Waters 径向加压 C4 半制备柱分离, 洗脱液为乙腈: 水 (23:77), 自动收集器收集, 用 HPLC C4 分析柱检测收集到的各组分。

分析结果显示 (图 13), 本发明人制备的 LDM, 其 AE 组分占 LDM 发色团总量的 90.63%。通过分析确定该 LDM 制品符合 LDM 的质量控制标准, 为 AE 高含量的 LDM 精制品, 将该 LDM 制品冻干, 置于 -80℃ 冰箱保存, 以便用于强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 的制

备。

用 Quattro LC 串联四机杆质谱仪分别对发色团进行质谱分析证实(图 14), 活性型发色团 AE 组分主峰的 m/z 为 844.4 ($M+1$), 其分子量为 843 kDa; 其芳构化产物的分子量为 845 kDa。

由于 AE 的烯二炔结构极不稳定, 约 1 h 后几乎全部失活, 因此上述整个操作过程必须在 4℃低温避光的情况下, 尽可能短的时间内连续完成, 以减少失活型发色团的产生。

实施例 6. 强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 的制备和分离

取如上述经过 AE 相对含量测定的 LDM 精制冻干品 10 mg, 加 5 ml 冷甲醇振摇 5 min, -20℃放置 1h, 中间振摇 1 次; 在 0℃, 12000 r/min 离心 20 min, 上清液富含 AE, 沉降物为肽链, 重复提取 2 次。自然蒸发浓缩甲醇溶液, 实验需在 4℃、避光进行。取一定体积和浓度的 Fv-LDP 溶于 0.01 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 中, 加 5 倍分子量的 AE 甲醇溶液(与 Fv-LDP 的磷酸缓冲液的体积比为 1: 50), 混合振摇, 室温放置 12 小时, 最后, 将混合液以 PD-10 柱(商业化的 Sephadex G-25 柱, Pharmacia 产品)层析分离纯化样品, 经 A280 nm 紫外监测后弃过量未反应的 AE, 收集强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 组分, 再经超滤浓缩, 冷冻干燥, 得纯化后 Fv-LDP-AE 于 -80℃保存备用。(图 6)。

实施例 7. 融合蛋白 Fv-LDP 的免疫学活性

用间接 ELISA 检测, 以 10 µg/ml 的 IV 型胶原酶(溶于 0.05 M, pH 7.4 的 PBS 中)100 µl/孔包被 96 孔酶标板, 置 4℃过夜作为抗原; 以 10^4 /孔的密度将 HT-1080 细胞或 HT-29 细胞接种于 96 孔板中 37℃培养过夜; 弃上清后, 以 0.25% 戊二醛固定细胞, 作为细胞抗原; 以 100 µl 10% 脱脂奶粉进行封闭, 每孔加入 100 µl 不同浓度梯度的

融合蛋白 Fv-LDP 于 37℃ 孵育 1 h, 随后以 100 μ l 1 μ g/ml 的抗 LDM 单抗 F9 为和 HPR 标记的羊抗鼠 IgG 抗体分别在 37℃ 孵育 1 h, 其间均以 PBS 洗 3-4 次, 最后于每孔加入 100 μ l OPD 底物反应液进行显色反应, 酶标仪测定 490 nm 处吸光值。结果显示, 如实施例 4 中所述制备的融合蛋白与 IV 型胶原酶、HT-29 和 HT-1080 肿瘤细胞的免疫反应性均为阳性, 结果参见图 7。

实施例 8. 融合蛋白 Fv-LDP 与人体肿瘤组织的免疫学活性

采用免疫组化试剂盒 (Boster 公司) 提供的链霉卵白素-生物素-酶联复合物 (SABC) 染色方法, 滴加正常山羊血清封闭液, 室温孵育 20 分钟; 吸取多余液体, 不洗, 直接滴加适当稀释的融合蛋白 Fv-LDP, 室温孵育; 再依次滴加适当稀释的 F9 单抗和生物素化的羊抗鼠 IgG 抗体, 最后滴加 SABC 试剂。以 DAB 试剂盒室温显色, 常规苏木素轻度复染, 脱水透明封片。观察染色结果 (图 8)。

结果显示, Fv-LDP 可与人体结肠腺癌组织中的 MMP-2/MMP-9 发生免疫反应而呈阳性染色, 其阳性染色颗粒位于结肠腺癌腺细胞样肿瘤细胞的胞浆内。

实施例 9. 融合蛋白 Fv-LDP 抑制肿瘤细胞分泌 IV 型胶原酶的活性

取对数生长期的人纤维肉瘤 HT-1080 细胞, 按 1×10^5 /ml/孔加于 24 孔培养板, 37℃, 5% CO₂ 培养 24 h; 弃培养液, 加入 200 μ l 无血清细胞生长培养液 (RPMI 1640, Roswell Park Memorial Institute 1640), 继续培养 2 h 后, 加入 100 μ l 的融合蛋白 Fv-LDP 于 37℃ 孵育 24 h 后, 吸取培养液, 500g 离心 5 min, 取少量细胞上清以常规蛋白定量法 (Bradford 法) 测定蛋白含量, 绘制标准曲线及测定样品的浓度, 以相应体积取上清进行非变性 PAGE 电泳。电泳完毕

后将凝胶放入 100 ml 2.5% Triton X-100 溶液中漂洗 30 min, 重复一次, 蒸馏水漂洗 2 次, 加入 100 ml 的 IV 型胶原酶缓冲液 (50 mM Tris-HCl, pH7.5, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 1 μM ZnCl₂), 37°C 孵育 16 h; 考马斯亮蓝 R250 染色脱色后观察负染的明胶水解条带。

结果表明, 融合蛋白 Fv-LDP 明显地抑制肿瘤细胞 HT-1080 分泌 IV 型胶原酶的活性 (图 9)。

实施例 10. 强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 抑制血管生成作用

以鸡胚尿囊膜法检测其对血管生成的抑制作用。将新鲜受精的白皮来航鸡种蛋气室端朝上, 37°C, 60% 湿度的恒温室中孵育 7 天后再消毒鸡蛋外壳, 以针刺入气室, 将 2 ml 空气吸入气室内以使鸡胚尿囊膜与血管卵膜分离, 同时以砂轮磨壳, 小心剥去外壳形成一个 2×2 cm² 小窗, 立即用透明胶带封好, 继续于 37°C, 60% 湿度的恒温室中孵育 24 h。至孵育第九天小心吸取 10 μl 的碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 滴加于预先准备好的琼脂载体盘中, 同时加入不同浓度的如实施例 6 所制备的强化融合蛋白 Fv-LDP-AE, 将载体盘置于大血管及胚心远端, 封窗, 继续于 37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 48 h 后观察。结果显示, Fv-LDP-AE 能明显抑制 bFGF 刺激鸡胚尿囊膜新生血管的生成 (图 10)。

实施例 11. 强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 对肿瘤细胞的细胞毒作用

用克隆形成法测定, 取对数生长期的 HT-29 细胞加入 96 孔培养板, 每孔 50 个细胞 /0.2 ml, 培养 24 h。10 倍稀释待测药物, 每浓度设 3 个平行孔, 每孔 50 μl, 37°C 温育 1 h, 无血清 PRMI 1640 培养液洗 2 次, 加入新鲜培养液, 继续培养 7 天, 第 7 天于镜下计数细胞集落。结果表明, 如实施例 6 所制备的 Fv-LDP-AE 的对肿瘤细

胞有强烈的杀伤作用，半数克隆抑制浓度 IC_{50} 为 $1.65 \times 10^{-16} M$ (图 11)。

实施例 12. 强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 的动物实验治疗方案

根据剂量初筛结果设计动物实验治疗的给药方式和剂量。领取体重为 18-22 g 的昆明小鼠 60 只，随机分为 6 组，每组 10 只。实验第 0 天，取小鼠肝癌 H22 腹水，以生理盐水稀释成细胞数为 $1.5 \times 10^6/ml$ ，按 0.2 ml/只接种于昆明小鼠腋窝皮下。小鼠皮下接种 H22 肿瘤 24 h 后，分别于实验第 1 和第 10 天给予生理盐水、Fv-LDP、游离 LDM 以及三个剂量的 Fv-LDP-AE，尾静脉注射给药 2 次。实验期间每 3-4 天测定肿瘤大小，以公式 $V (cm^3) = 1/2ab^2$ (a: 肿瘤长径, b: 肿瘤短径) 计算肿瘤体积和抑瘤率。

实验第 21 天结果表明，如实施例 6 所制备的本发明强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 体内有显著的疗效，于 0.8、1.6、3.2 mg/kg 的剂量时，可明显抑制肝癌 H22 皮下瘤的生长，如下表所示：

Fv-LDP-AE 对小鼠移植性肝癌 H22 的生长抑制作用

组别	剂量 (mg/kg)	小鼠数量 实验开始/结束	体重变化 (g)	肿瘤体积(cm^3) $\bar{x} \pm SD$	抑制率 (%)
空白对照	-	10/10	22	14.6 ± 4.3	
LDM	0.05	10/10	19.5	4.3 ± 2.6	70.3*
Fv-LDP	2.4	10/10	15.7	11.9 ± 5.8	18.7
Fv-LDP-AE	3.2	10/10	4.5	0.6 ± 0.3	95.9* [△]
Fv-LDP-AE	1.6	10/10	8.7	1.8 ± 1.2	87.8* [△]
Fv-LDP-AE	0.8	10/10	9.7	2.1 ± 1.1	85.7* [△]

* 与空白对照组相比， $P < 0.01$ ，[△] 与 LDM 组相比， $P < 0.05$ 。

从肿瘤生长曲线 (图 12) 可见，Fv-LDP-AE 在 3.2 mg/kg 剂量时疗效尤其显著，其第 14、17、21 天的抑制率分别为 92.2%、95.2%、

95.9%。治疗期间，动物的体重无明显变化，一般状况良好，表明动物可耐受所用剂量。

权 利 要 求

1. 一种强化融合蛋白 Fv-LDP-AE, 其特征在于它由抗 IV 型胶原酶单链抗体 scFv、力达霉素辅基蛋白 LDP、二者之间的柔性肽间隔基 GGGGS、组氨酸六聚体尾形成的融合蛋白 Fv-LDP 以及力达霉素活性型发色团 AE 组成。
2. 权利要求 1 所述的强化融合蛋白 Fv-LDP-AE, 其特征在于所述融合蛋白 Fv-LDP 的编码基因如 SEQ ID NO: 1 所示, 其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。
3. 一种强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 的制备方法, 其包括:
 - a. 融合蛋白 Fv-LDP 的制备;
 - b. 通过采用 AE 高比例的 LDM 与所述融合蛋白 Fv-LDP 进行分子强化。
4. 权利要求 3 所述的制备方法, 其中将 Fv-LDP/0.01 M PBS (pH 7.0) 与 AE 甲醇溶液按分子比 1: 5, 体积比 1: 50 混合搅拌, 室温反应 12 h, 得到强化融合蛋白 Fv-LDP-AE。
5. 权利要求 3 所述的制备方法, 其中所述 AE 高比例的 LDM, 其 AE 占发色团总量的百分比值为至少 80%, 特别优选的 AE 百分比值为 90%。
6. 权利要求 1 所述的强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 在制备抑制血管生成和抗肿瘤新型抗体导向药物中的应用。

7. 权利要求 6 所述的应用，其中所述肿瘤包括选自消化道肿瘤的结肠癌、直肠癌、食管癌、胃癌、肝癌以及乳腺癌、卵巢癌、肺癌和肾癌的实体瘤。
8. 一种药物组合物，其中含有治疗有效量的权利要求 1 所述的强化融合蛋白，以及任选的，药学可接受的载体和 / 或赋形剂。
9. 一种治疗患者肿瘤的方法，包括向肿瘤患者施用治疗有效量的权利要求 1 所述的强化融合蛋白或权利要求 8 的药物组合物。

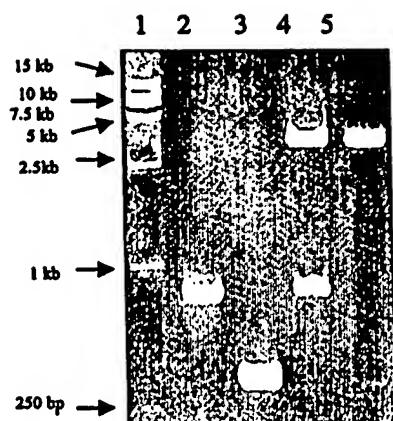


Fig. 1

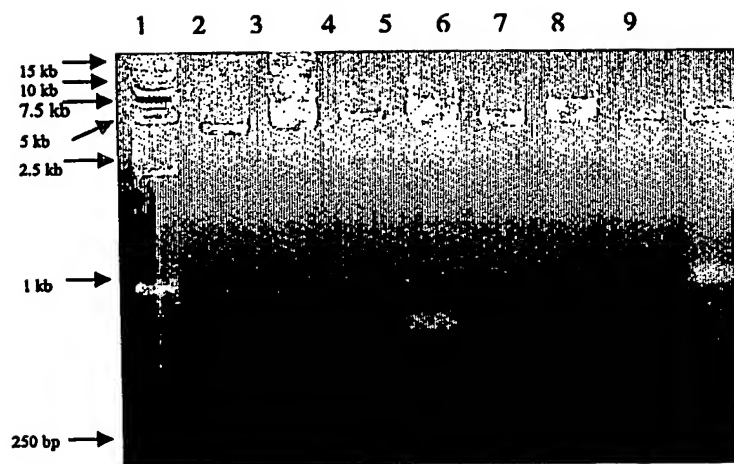


Fig. 2

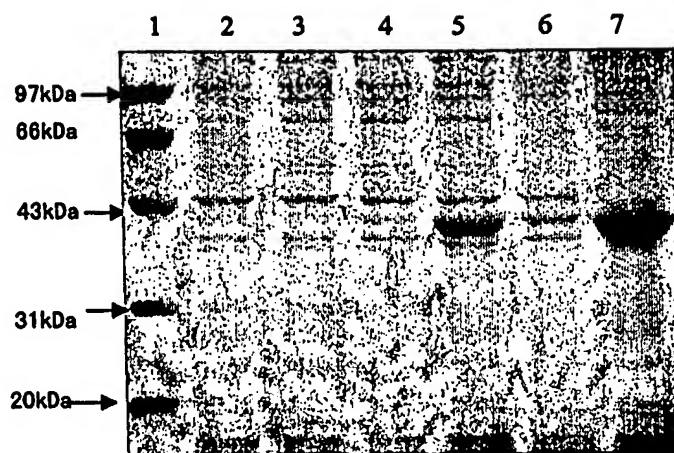


Fig. 3

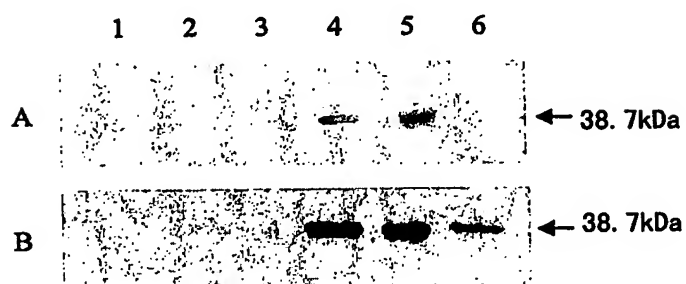


Fig. 4

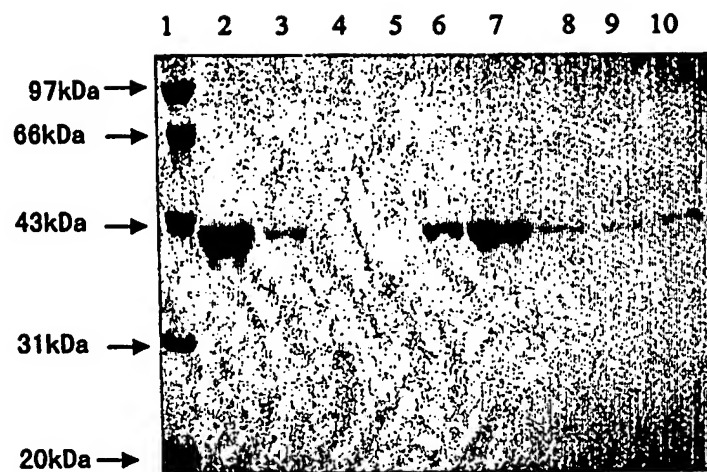


Fig. 5

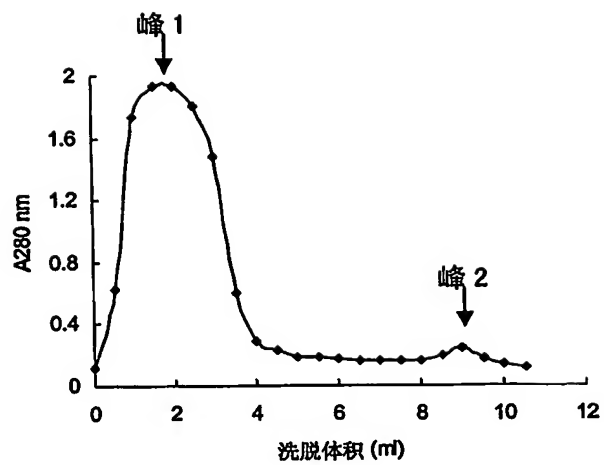


Fig. 6

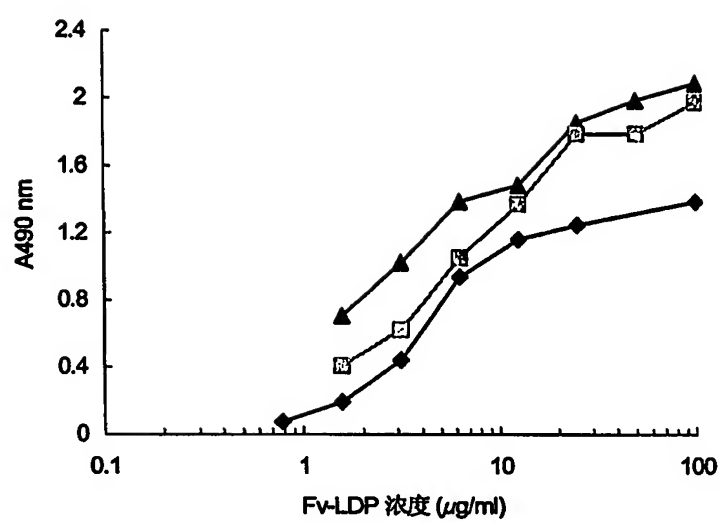


Fig. 7



Fig. 8

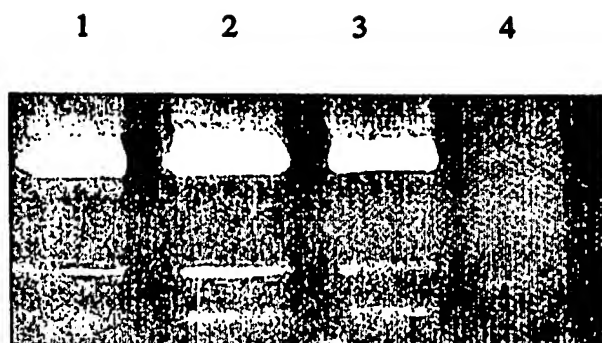


Fig. 9

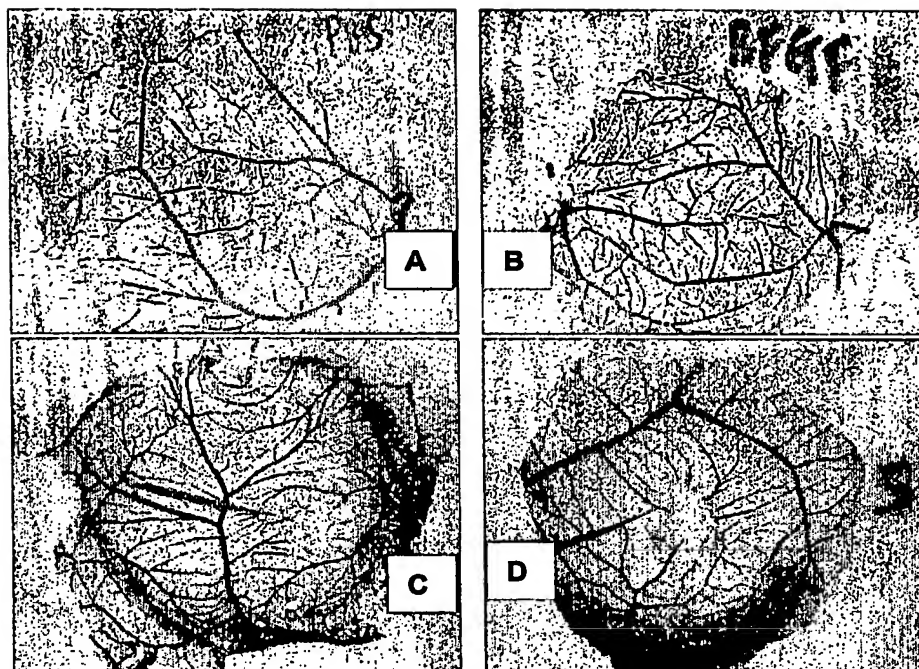


Fig. 10

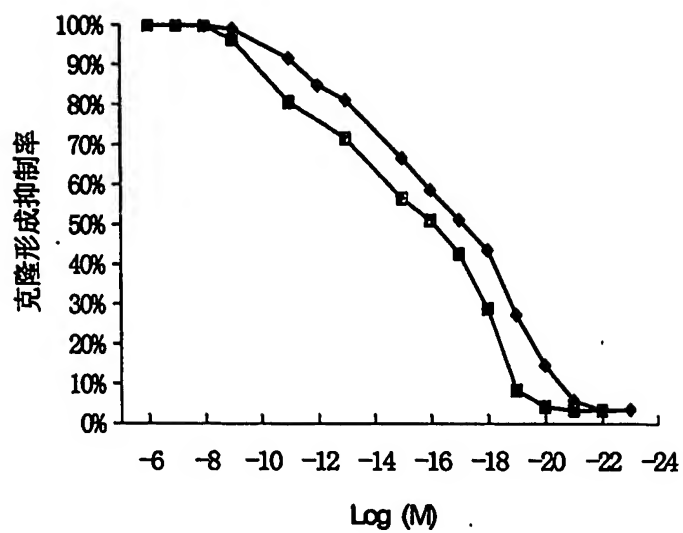


Fig. 11

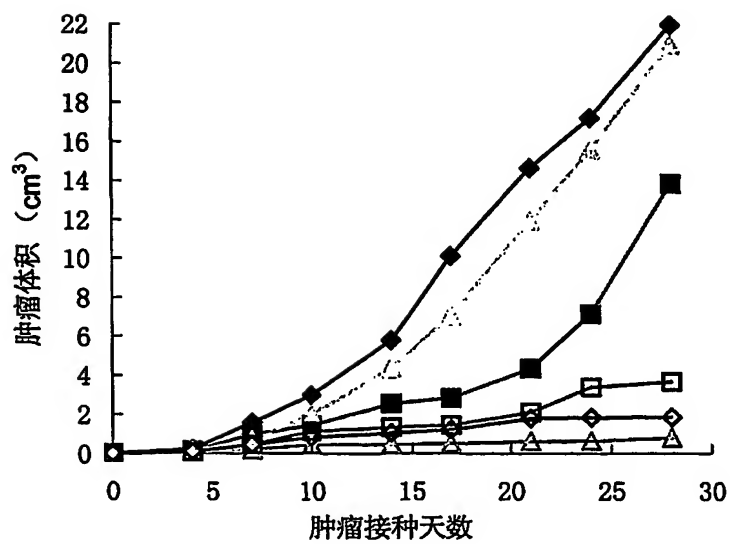
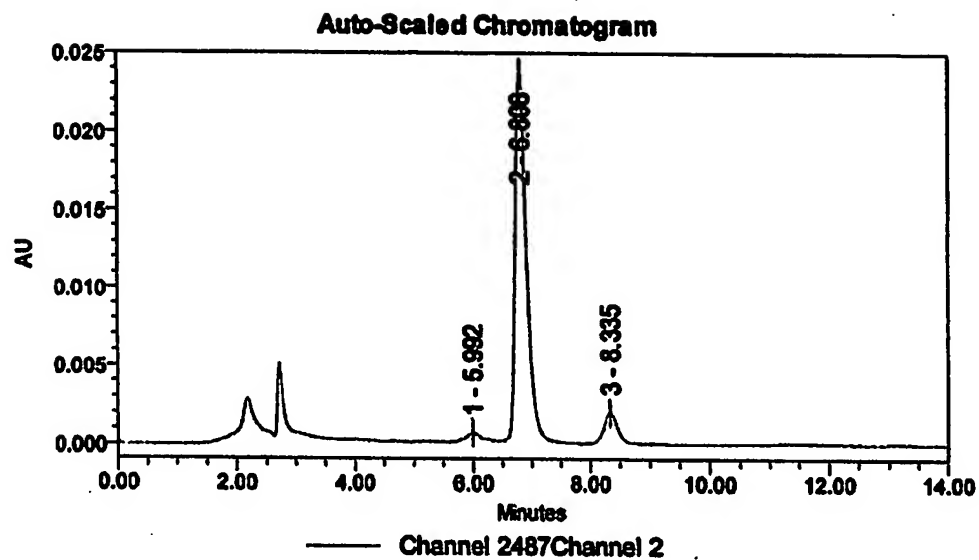


Fig. 12



	Name	Retention Time (min)	Height	Area	% Area
1	1	5.992	355	4047	1.19
2	2	6.808	23694	308599	90.83
3	3	8.335	1897	27866	8.18

Fig. 13

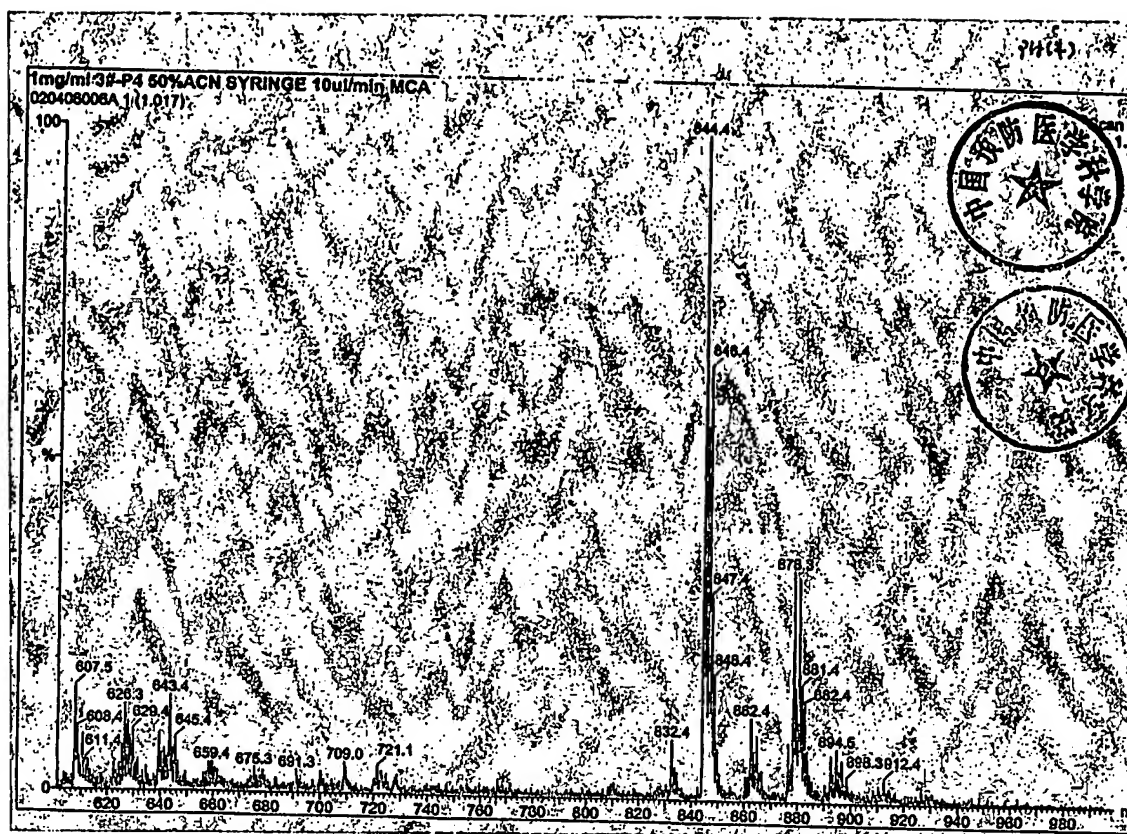


Fig. 14

序列表

<110> 中国医学科学院医药生物技术所

<120> 有抑制血管生成及抗肿瘤作用的强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 及其用途

<130> IEC030032PCT

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1119

<212> DNA

<213> artificial

<400> 1

atgcaggtga agctgcagca gtctggaact gaagtggtaa agcctggggc ttcagtgaag	60
ttgtcctgca aggcttcttg ctacatcttc acaagttatg atatagactg ggtgaggcag	120
acgcctgaac agggacttga gtggattgga tggatttttc ctggagaggg gagtactgaa	180
tacaatgaga agttcaaggg cagggccaca ctgagtgtag acaagtcctc cagcacagcc	240
tatatggagc tcactaggct gacatctgag gactctgctg tctatttctg tgctagaggg	300
gactactata ggcgctactt tgacttgtgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca	360
ggtggaggcg gttcaggcgg aggtggctct ggcggtggcg gatcggacat cgagctcact	420
cagtctccag cttctttggc tgtgtctcta gggcagaggg ccaccatata ctgcagagcc	480
agtgaagtg ttgatactta tggcgatact tttatgtact ggtaccagca gaaaccagga	540
cagccacca aactcctcat ctatcttgca accaacctag gatctggggt ccctgccagg	600
ttcagtggca gtgggtctag gacaaacttc accctcacca ttgatcctgt ggaggctgat	660
gatgctgcaa cctattactg tcagcaaaat aatgaggatc cgtacacgtt cggagggggc	720
accaagctgg aaatcaaacg tgggtggaggc gggtcaccat gggcgcccgc cttctccgtc	780

agtcccgccct cgggtctgag tgacggacag agcgtgtcgg tgtcggtcag cggtgccgcc 840
 gccggcgaga cctactacat cgcccagtgc gtcctcggtcg gtggccagga cgcgtgcaac 900
 ccggcgaccg cgacgtcctt caccacggac gcgtccggag cggcgtcgtt cagcttcgtc 960
 gtgcgcaagt cgtacacggg ctccacgccc gaaggcacgc cggtcggcag cgtcgactgc 1020
 gccacggccg cctgtaacct cggcgccggc aactccgggc tcgacctcgg ccacgtggct 1080
 ctgaccttcg gcctcgagca ccaccaccac caccactga 1119

<210> 2
 <211> 372
 <212> PRT
 <213> artificial

<400> 2

Met Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Val Val Lys Pro Gly
 1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser
 20 25 30

Tyr Asp Ile Asp Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Glu Gly Ser Thr Glu Tyr Asn Glu Lys
 50 55 60

Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 65 70 75 80

Tyr Met Glu Leu Thr Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe
 85 90 95

Cys Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Asp Ile Glu Leu Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gln Ser Pro Ala
130 135 140

Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala
145 150 155 160

Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr Gly Asp Thr Phe Met Tyr Trp Tyr Gln
165 170 175

Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Thr Asn
180 185 190

Leu Gly Ser Gly Val Pro Ala Gly Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr
195 200 205

Asn Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr
210 215 220

Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly
225 230 235 240

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Glu Phe Ala Pro
245 250 255

Ala Phe Ser Val Ser Pro Ala Ser Gly Leu Ser Asp Gly Gln Ser Val
260 265 270

Ser Val Ser Val Ser Gly Ala Ala Ala Gly Glu Thr Tyr Tyr Ile Ala
 275 280 285

Gln Cys Ala Pro Val Gly Gly Gln Asp Ala Cys Asn Pro Ala Thr Ala
 290 295 300

Thr Ser Phe Thr Thr Asp Ala Ser Gly Ala Ala Ser Phe Ser Phe Val
 305 310 315 320

Val Arg Lys Ser Tyr Thr Gly Ser Thr Pro Glu Gly Thr Pro Val Gly
 325 330 335

Ser Val Asp Cys Ala Thr Ala Ala Cys Asn Leu Gly Ala Gly Asn Ser
 340 345 350

Gly Leu Asp Leu Gly His Val Ala Leu Thr Phe Gly Leu Glu His His
 355 360 365

His His His His
 370

<210> 3
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> artificial

<400> 3
 cgcatatgca ggtgaagctg cagcagtct

29

<210> 4
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> artificial

<400> 4
 cggaattctg aaccgcctcc accacgtttg atttcag

38

<210> 5
<211> 32
<212> DNA
<213> artificial

<400> 5
cggaattcgc gcccgcttc tccgtcagtc cc

32

<210> 6
<211> 33
<212> DNA
<213> artificial

<400> 6
ccgctcgagt cagccgaagg tcagagccac gtg

33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2004/000842

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7 C07K19/00 C12N15/62 A61K39/395 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 C07K C12N A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, WPI, PAJ, EPODOC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LI Shun-Qiang et al.: "An Engineered and Assembled Fusion Protein of Antitumor Antibiotic Lidamycin and scFv Directed against Type IV Collagenase." Acta Pharmaceutica Sinica, vol 35, no.7, July 2000, pages 488-491, the whole document	1,3,6-8
Y		2
Y	TANG Yong et al.: "Expression of Anti-Type IV Collagenase scFv Fragment and Inhibition of Tumor Cells Invasion." Chinese Journal of Cancer, vol 20, no 8, Aug 2001, pages 801-805, the whole document	2
A	CN 1284566A, 21 Feb. 2001(2001-02-21), the whole document	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 20.October.2004(20.10.2004)	Date of mailing of the international search report 04 · Nov 2004 (04 · 11 · 2004)
Name and mailing address of the ISA/ 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, 100088 Beijing, China Facsimile No. (86-10)62019451	Authorized officer Yang Zhenyu Telephone No. (86-10)62085073



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2004/000842

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:9
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
See PCT Rule 67.1.(iv).: Methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2004/000842

A. 主题的分类

IPC7 C07K19/00 C12N15/62 A61K39/395 A61P35/00

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC7 C07K C12N A61K A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNPAT, WPI, PAJ, EPODOC

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	李顺强, 江敏, 甄永苏。抗癌抗生素力达霉素与抗 IV 型胶原酶单链抗体的基因工程组装融合蛋白。药学学报, 2000, 35 (7), 488-491。	1, 3, 6-8
Y		2
Y	唐勇, 甄永苏。抗 IV 型胶原酶单链抗体的表达及其对肿瘤细胞侵袭的抑制作用。癌症, 2001, 20: 801-805。	2
A	CN 1284566A, 2001 年 2 月 21 日 (2001-2-21)	1-8

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☐ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2004 年 10 月 20 日 (20.10.2004)

国际检索报告邮寄日期

04.11.2004 (04.11.2004)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

授权官员

杨振宇

电话号码: (86-10)62085073



国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2004/000842

第II栏 关于某些权利要求不能作为检索主题的意见(接第1页第2项)

按条约 17(2)(a)对某些权利要求未作国际检索报告的理由如下:

1. ☒ 权利要求: 9

因为它们涉及到不要求本国际检索单位进行检索的主题, 即:

PCT 细则 67.1 (iv) 规定的治疗人体或动物体的外科手术或者疗法以及诊断方法。

2. ☐ 权利要求:

因为它们涉及到国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索,
具体地说:

3. ☐ 权利要求:

因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则 6.4(a)第 2 句和第 3 句的要求撰写。

第II栏 关于缺乏发明单一性时的意见(接第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告针对全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本国际检索单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说, 是权利要求:

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求中首次提及的发明;
包含该发明的权利要求是:

关于异议的说明: ☐ 申请人的异议书随附加检索费同时提交。

☐ 支付附加检索费时未提交异议书。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.